

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11) Numéro de publication:

0 083 267
A1

(12)

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(21) Numéro de dépôt: 82402300.6

(51) Int. Cl.³: **C 12 N 11/04**
C 12 N 1/04, C 05 F 11/08

(22) Date de dépôt: 15.12.82

(30) Priorité: 29.12.81 FR 8124403

(43) Date de publication de la demande:
06.07.83 Bulletin 83/27

(84) Etats contractants désignés:
DE FR GB IT SE

(71) Demandeur: RHONE-POULENC S.A.
25, quai Paul Doumer
F-92408 Courbevoie(FR)

(72) Inventeur: Jung, Gérard
rue des Grands Jardins
Leuville-sur/orge F-91310 Montlhéry(FR)

(72) Inventeur: Mugnier, Jacques
63, rue de Cherche Midi
F-75006 Paris(FR)

(74) Mandataire: Martin, Henri et al.
RHONE-POULENC RECHERCHES Service Brevets
Chimie et Polymères 25, quai Paul Doumer
F-92408 Courbevoie Cedex(FR)

(54) Préparation d'inoculum à faible activité de l'eau à résistance améliorée à la température et à la réhydratation.

(57) La présente invention a trait à un procédé de préparation d'inoculum à faible activité de l'eau ayant une longue viabilité et une résistance améliorée à la température et à la réhydratation.

Le procédé selon la présente invention se caractérise en ce que après inclusion du micro-organisme dans un gel de polymère l'on abaisse et on maintient l'activité de l'eau dans l'inoculum en-dessous de 0,1 et que la réhydratation est favorisée par la présence du gel et de la source hydrocarbonée présente dans le milieu.

Ce procédé s'applique au préenrobage des graines et à l'inoculation du sol.

EP 0 083 267 A1

PREPARATION D'INOCULUMS A FAIBLE ACTIVITE DE L'EAU A RESISTANCE
AMELIOREE A LA TEMPERATURE ET A LA REHYDRATATION

La présente invention a pour objet un nouveau procédé de
5 préparation d'inoculums à faible activité de l'eau ainsi que les
produits obtenus, lesquels présentent une longue viabilité et une
résistance améliorée à la température et à la réhydratation.

Elle a trait plus particulièrement à l'inclusion de micro-
organismes du genre Rhizobium dans une matrice constituée par un gel
10 de polymère, à des fins agronomiques.

Depuis de nombreuses années, on a cherché à conserver les
Rhizobium par deshydratation à l'aide d'adjuvants divers : sur des
billes de porcelaine deshydratées (HUNT, 1958 J. Bacteriol. 76,
453-454), dans des huiles liquides deshydratées (Brevet US
15 3.034.968), dans de l'huile mélangée avec du talc ou du kaolin
(US 3.168.796) sur du plâtre (GB 1 490 046), sur du gypse (FRASER,
1975 J. Appl. Bacteriol. 39, 345), à l'aide de sulfate de sodium
(NILSSON 1957 Rev. Sci. Instrum. 11, 212).

Le procédé de deshydratation selon les références
20 ci-dessus est lent et hasardeux ce qui nuit à la survie du
micro-organisme (Gault dans Newsletters, vol. 21 (1) Avril 1981,
p. 34 et Vincent dans Rhizobium Newsletter, 25, 1981 et d'autres
auteurs).

Les étapes conduisant à l'état deshydraté seraient la cause de
25 la destruction du Rhizobium.

On a aussi proposé des procédés tels que la lyophilisation
(US n° 3 168 796) ou l'atomisation (OCHIN 1980, thèse Lille).

Mais dans ces deux derniers cas, différentes substances pro-
tectrices ou supports sont utilisés : lactose, lait, chlorhydrate
30 de cysteine, maltodextrine ou des substances chimiquement inertes et
finement divisées du type kaolin, charbon activé.

Mais même avec l'addition de ces substances protectrices, le
procédé de séchage, la conservation et la réhydratation sont très
difficiles.

35 La réhydratation est considérée comme un procédé hasardeux.

Il est connu, en effet, que la reprise d'eau progressive par un
micro-organisme totalement deshydraté est létale (Amarger, Arch.

Mikrobiol 81, 361 - 366 (1972). Lorsque par exemple une ampoule lyophilisée contenant des micro-organismes est ouverte, en moins de huit jours à l'air ambiant tous les micro-organismes sont morts.

5 Il est donc possible de conserver une partie des micro-organismes par une deshydratation poussée mais lorsqu'il faudra l'utiliser en plein champ, l'emploi d'une solution nécessaire pour la rehydratation va poser de nombreux problèmes.

10 Le but poursuivi depuis de nombreuses années est d'obtenir un micro-organisme inclus dans un polymère qui puisse se conserver indéfiniment sans conditions spéciales et qui se présente sous une forme solide au moment de son utilisation.

15 Ce problème étant difficile à résoudre, un préjugé consiste à considérer que pour assurer la survie des micro-organismes, il faut conserver dans les inoculums une certaine humidité.

20 De cette manière, le milieu de culture est apporté sur un support tel que la tourbe, ou dans un gel polymère tel quel où l'on essaie de réduire la perte en eau, ou tout au moins de maintenir une disponibilité de l'eau (ou une activité de l'eau) dans l'inoculum qui renferme, outre le micro-organisme, des éléments minéraux solubles, une source hydrocarbonée telle que mannitol et une source azotée telle que l'extrait de levure.

25 C'est ainsi que dans le brevet US n° 4 155 737, on a proposé l'inclusion d'un micro-organisme dans un gel de polymère. Selon ce brevet, le gel polymère peut être constitué par un gel de polyacrylamide ou un gel de silice.

Or, l'on sait que pratiquement le polymère doit être biodégradable ou tout au moins non polluant.

30 C'est pourquoi, dans la demande européenne 17 565 au nom de la demanderesse, on a revendiqué de choisir comme support une matrice à base d'au moins un polymère du groupe des polysaccharides, ce procédé se caractérisant par le fait que l'on fait subir audit gel contenant le micro-organisme un séchage qui laisse subsister au moins une partie de l'eau solvante. Ce séchage peut être amélioré
35 par addition d'une substance à forte absorption d'eau telle qu'une silice synthétique ou naturelle.

En général, afin de s'assurer d'une bonne survie des micro-organismes, l'on maintient une activité de l'eau à une valeur

avantageusement supérieure à 0,85. Mais l'on sait que pour les humidités optimales requises dans les inoculums référencés dans ces brevets, par exemple pour la survie des Rhizobium, la germination
5 des spores de champignons et le développement des moisissures et contaminants est à craindre pour des produits non stériles.

Plus généralement pour la plupart des moisissures, l'activité de l'eau, limite au-delà de laquelle un développement microbien est possible est comprise entre 0,80 et 0,95 mais on trouve aussi
10 certaines moisissures capables de se développer à des activités de l'eau plus basses, celles-ci sont dites "xérophiles " ou " osmo-tolérantes " pour désigner l'ensemble des micro-organismes capables de se développer dans un milieu à faible activité de l'eau ($a_w = 0,6-0,7$).

15 Il est donc nécessaire pour assurer la stabilité microbiologique des inoculums, pour une teneur en eau optimale, de préparer et de stocker les inoculums stérilement ou d'assurer leur conservation au froid ; la stabilité des inoculums réfrigérés résulte à la fois de l'abaissement de la température et du blocage d'une
20 fraction d'eau disponible pour les contaminants ; l'intégrité de l'inoculum est respectée, mais au prix des lourdes contraintes de la chaîne de froid.

En règle générale, ces inoculums demeurent fragiles vis-à-vis des contaminants et résistent mal au-delà d'une quarantaine de
25 degrés, ce qui est un inconvénient dans les pays chauds, ou de manière générale, lors de la conservation du fait d'un risque certain de contamination.

Pour maîtriser les différents processus de dégradation : développement de micro-organismes, réactions chimiques, réactions
30 enzymatiques, altération de la texture, on peut agir plus ou moins sélectivement sur chacun de ces phénomènes en jouant sur les paramètres habituels de la physico-chimie, température, pH, potentiel redox, utilisation d'inhibiteurs spécifiques.

Mais ces moyens se sont avérés limités. Ceci vient en particulier du fait que comme souligné précédemment, l'enseignement de
35 l'art antérieur repose sur le principe que l'eau disponible doit être suffisante pour assurer la survie du micro-organisme.

Des travaux importants de la demanderesse ont mis en évidence que partant des valeurs habituelles de l'activité de l'eau dans les inoculum, de l'ordre de 0,35 et plus, si l'on abaissait l'activité de l'eau, il y aurait bien, dans un premier temps, diminution du développement des moisissures et des réactions enzymatiques, mais
5 que l'on observait une plasmolyse importante des cellules, et des réactions de brunissement.

Le phénomène est similaire lorsque l'on passe d'une activité de l'eau très basse vers une activité de l'eau de l'ordre de 0,85
10 au plus.

En effet, le passage aux activités de l'eau intermédiaires de l'ordre de 0,4 à 0,8 est léthal pour les bactéries que ce passage soit réalisé à la deshydratation ou à la rehydratation.

Pour la deshydratation on est amené à vaincre ce phénomène par
15 un passage extrêmement rapide de cette zone léthale à l'aide de la lyophilisation (brevet US n° 3 168 796) ou à l'aide de l'atomisation.

Mais cette technique ne résout pas le problème de la rehydratation, dans les conditions d'application où la rehydratation est
20 lente et progressive.

Le concept de l'invention consiste à extraire du produit la fraction d'eau la plus disponible, à éliminer toute l'eau solvante, (telle que définie par exemple par LEUNG. H. K 1981 Structure and properties of water - Cereal food World 26 7-350-352) et à utiliser
25 les caractéristiques du mélange gel et substances solubles pour éviter de manière tout à fait inattendue pour l'homme du métier l'apparition de ces phénomènes néfastes lors de la rehydratation.

La valeur de l'activité de l'eau au delà de laquelle on n'a plus de développement de moisissures, de réactions enzymatiques
30 et de réactions de brunissement dépend également des conditions du milieu, de la nature du micro-organisme et du gel.

On peut admettre que d'une manière générale, pour les valeurs minimales de l' a_w , on conserve un nombre maximum de cellules
viables.

35 Les différentes valeurs de l'activité de l'eau sont obtenues et déterminées par la méthode dite des solutions aqueuses saturées

(Multon 1981 Techniques d'analyses et de contrôle dans les industries agro-alimentaires - APRIA -).

5 Le procédé selon l'invention se caractérise par le fait qu'on inclut le micro-organisme dans son milieu de culture dans un gel de polymère et que l'on abaisse l'activité de l'eau dans l'inoculum en dessous de 0,1 et qu'on la maintient à cette valeur.

10 Les différentes valeurs optimales de l'activité de l'eau pour la protection du micro-organisme lors de son stockage et lors de sa rehydratation dépendent notamment de la température, de la nature du micro-organisme, de la nature et de la concentration des composés présents, et du type de polymère utilisé.

15 La connaissance de la vitesse de destruction des micro-organismes à la température est un paramètre nécessaire pour la mise au point de procédés de préparation très sûrs pour un inoculum. Les travaux de la demanderesse ont montré que la résistance des micro-organismes dans les inoculums aux températures élevées (60°C) était maximale pour les valeurs de l'activité de l'eau les plus faibles et que la perte de la survie intervenait rapidement à ces mêmes
20 températures quand ces valeurs allaient vers 0,5.

Les travaux de la demanderesse ont également montré que lors de la rehydratation, la vitesse de destruction des micro-organismes aux activités de l'eau intermédiaires de l'ordre de 0,4-0,8 est fonction de la source hydrocarbonée du milieu de culture et du gel.

25 On peut avancer l'hypothèse selon laquelle la survie des micro-organismes est sous la dépendance de la disponibilité de l'eau qui jouerait le rôle de réactif en mettant en solution les composés solubles ou partiellement solubles présents dans le milieu.

30 La mobilité de ces composés, par suite de phénomène d'osmose, entrainerait la destruction des micro-organismes.

Les travaux de la demanderesse ont, en plus, montré que l'évolution des isothermes de sorption des inoculums, et par là l'activité de l'eau, était modifiée par le mode d'obtention de l'isotherme (phénomène d'hystérésis), par la température, par la
35 nature du gel, par la nature et la concentration des sources hydrocarbonées et des substances solubles du milieu de culture, par la modification du milieu de culture par le micro-organisme, par les phénomènes de cristallisation des composés cristallisables présents.

Ces travaux ont montré, en outre, les caractéristiques spécifiques d'hygroscopicité de différents polymères utilisés selon leur nature ou leur mode d'obtention.

5 Le polymère utilisé est avantageusement du groupe des polysaccharides auquel on fait subir un traitement de réticulation au moins partiel.

Par traitement de réticulation au moins partiel, on entend un traitement susceptible de modifier la structure du polysaccharide, tel que traitement thermique, traitement par un sel métallique ou
10 alcalino-terreux ou au moyen d'un autre polymère et de préférence par un autre polysaccharide.

Le sel métallique est tel que de fer ou d'aluminium.

Le sel alcalino-terreux est tel que de calcium.

15 Avantageusement le polymère est à base d'un hétéro-polysaccharide à haut poids moléculaire obtenu par fermentation d'un hydrate de carbone par un micro-organisme du genre Xanthomonas ou Arthrobacter ou par des champignons appartenant au genre Sclerotium.

20 On peut également faire appel à des polysaccharides issus de gommes naturelles ou biosynthétiques, de provenance diverses : algues (alginates, carraghénanes, agar), exsudats de plantes (gommes karaya, adragante, arabique) et de graines (guar, caroube).

Comme déjà dit, avantageusement on fait appel à des polymères
25 à base de polysaccharides qui vont influencer sur le devenir du micro-organisme dans le sol suite à l'inoculation :

- la taille des particules de polymère permet la meilleure dissémination des Rhizobium.

- la poudre de polysaccharide se réhumidifie rapidement ;

30 - le polysaccharide se lie aux particules de sols et autres substrats et aux racines ;

- le polysaccharide est rapidement dégradé dans le sol, les Rhizobium sont libérés de leur matrice de polymère et infectent les racines de la légumineuse.

35 Selon l'invention, le milieu de culture renferme au moins une source hydrocarbonée. Celle-ci est telle que du groupe des sucres, des polyols et des polysaccharides. On peut citer par exemple comme source hydrocarbonée le mannitol, le glucose, la dextrine, l'amidon.

La source hydrocarbonée doit comporter de préférence des sucres supérieurs à C_6 et tout particulièrement le mannitol, le sorbitol ou le fructose.

- 5 Le milieu de culture renferme également avantageusement au moins un sel minéral.

Le milieu de culture renferme également une source azotée minérale organique telle que l'extrait de levure par exemple de composition suivante :

10	Amino	5,5
	NaCl	0,5
	Ca	0,08
	Fe	0,20
	K	3,4
15	Mg	0,07
	P	1,16
	Hydrates de carbone	16,6
	Arginine	3,5
	Cystine	1,6
20	Histidine	1,5
	Isoleucine	4,7
	Leucine	6,4
	Lysine	6,5
	Methionine	2,0
25	Phénylalanine	3,5
	Thréonine	3,3
	Tryptophane	1,0
	Tyrosine	4,0
	Valine	4,8
30	Vitamines	2,7 cg/g.

Il est à noter que la source azotée ne contient pas de molécules de haut poids moléculaire. Sa concentration dans le milieu avant toute culture est de l'ordre de 0,1 % mais l'extrait est partiellement consommé au cours de la culture.

- 35 L'ensemble gel, sel minéral, source hydrocarbonée et source azotée constitue entre 2 et 10 % en poids de la suspension à sécher.

Le polymère représente entre 1 et 2 % de la suspension à sécher. La source hydrocarbonée représente entre 0,5 % et 1 % et l'extrait

de levure entre 0,05 % et 0,1 % du milieu de culture.

On peut ajouter à la solution avant séchage des additifs tels que ceux précédemment cités ou tout autre produit inerte tout en
5 restant dans les limites précédemment données (2 à 10 % de la suspension à sécher).

Le micro-organisme utilisé dans la présente invention est notamment du genre Rhizobium.

Parmi les micro-organismes du genre Rhizobium utilisés pour
10 la présente invention, on peut citer : Rhizobium Japonicum, Rhizobium meliloti, Rhizobium phaseoli, Rhizobium leguminosarum, Rhizobium trifolii.

Les Rhizobium sont parmi les micro-organismes les plus sensibles à la température et à la deshydratation. Il est connu que
15 les bactéries gram négatif sont particulièrement sensibles à la dessiccation (Soil Biol. Biochem. Vol. 14 p. 13-14 1982), et les Rhizobium confirment cette affirmation.

Parmi les espèces de Rhizobium, le Rhizobium Japonicum USDA 138 a été décrit par F. Munévar (Applied and Environmental
20 Microbiology, Aug. 1981 p. 272-276) comme ayant une température maximale de survie de 39,1° Celsius.

Ce micro-organisme contrairement à de nombreux autres qui sont thermorésistants comme par exemple les Bacillus ne peut à la lecture de l'art antérieur être séché à haute température sans risque.

25 Le milieu de culture privilégié utilisé pour la croissance du Rhizobium Japonicum est le milieu YEM, milieu classique bien connu de l'homme de l'art.

La concentration bactérienne peut être augmentée par centrifugation préalable du milieu de culture et remise en suspension
30 du culot bactérien.

Le milieu de culture ou la suspension bactérienne est ensuite apporté à un gel de polysaccharide dans lequel le micro-organisme est inclus, puis le gel est séché.

On peut aussi, selon une autre forme de mise en oeuvre, dis-
35 soudre le polysaccharide dans le milieu de culture.

Le séchage peut se faire de diverses manières, en une ou plusieurs étapes.

Selon l'invention, un simple contact à l'air dans les condi-

tions habituelles de température et d'humidité relative n'est pas suffisant.

L'on doit faire appel à des techniques qui permettent d'obtenir
5 une dessiccation plus poussée telles que :

- flux d'air chaud et sec, évidemment dans les conditions compatibles avec la survie du micro-organisme.

- solution saturée, en un composé présentant l'activité de l'eau requise, évoluant vers l'équilibre avec l'inoculum.

10 Par ailleurs, on peut apporter l'inoculum sur un support tel que à base de silice.

Dans le cas où l'on fait appel à une méthode impliquant un absorbant tel que la silice, cet absorbant peut en plus remplir une fonction de support et charge inerte, facilitant la mise en oeuvre
15 et la manipulation de l'inoculum.

On peut en particulier faire appel à une technique de séchage par atomisation, qui, de manière inattendue conduit à des inocu-
lums dans lesquels la survie du micro-organisme est préservée alors même que les températures des gaz de traitement sont largement supé-
20 rieures à celles que le micro-organisme peut subir.

Dans le cas de l'atomisation, le gel à sécher doit posséder des propriétés de "coulabilité".

Dans ce cas éventuellement, la réticulation du polymère peut être provoquée par le traitement thermique lors du séchage.

25 Bien évidemment, on peut combiner plusieurs de ces techniques.

Du point de vue économique, il est préférable d'adopter un système de séchage bi-étagé comme celui utilisé pour la deshydratation du lait. Ce système se compose d'un séchage par atomisation qui lorsqu'il est effectué avec une température de sortie d'environ
30 95° C conduit à une activité de l'eau de l'ordre de 0,2 à 0,4 puis un séchage par lit fluidisé jusqu'à une activité de l'eau inférieure à 0,1.

L'utilisation d'un système bi-étagé permet d'augmenter le débit de la substance à sécher, par conséquent l'écart de température entre la sortie et l'entrée. La solution entrant dans l'atomi-
35 seur peut contrairement à un préjugé établi être soumise à une température de 250°C et plus sans aucune perte de survie des micro-organismes. La température de sortie est maintenue au-dessus du

point de rosée ce qui évite une rehydratation des produits. Cette température est notamment de l'ordre de 75° C à 95° C.

Le lit fluidisé utilisé pour terminer le séchage et atteindre
5 une activité de l'eau inférieure à 0,1 consomme 2 à 4 fois moins
d'énergie pour l'élimination de la dernière fraction d'eau que
l'atomisation. Globalement l'économie d'énergie réalisée par rapport
à un atomiseur simple est de l'ordre de 20 %.

Les polymères séchés peuvent se présenter sous diverses formes :
10 gels, billes, fibres.

Avantageusement, on cherche à présenter les inoculums obtenus
sous forme de poudre ou microgranulés pour faciliter leur mise en
oeuvre.

15 La limitation des transferts d'eau entre l'inoculum polymère à
faible activité de l'eau et l'atmosphère environnante doit être
réalisée par le choix d'un mode d'emballage adapté.

La caractéristique principale de l'emballage sélectionné est
son imperméabilité à la vapeur d'eau. Cela suppose que l'emballage
20 ait été parfaitement réalisé, c'est-à-dire qu'il ne présente ni
microporosité, ni microcanaux de fuite aux soudures. Dans
l'emballage, il s'établit un équilibre de pression d'eau entre
l'atmosphère interne et l'inoculum ; une fois l'équilibre atteint,
la capacité d'absorption d'eau de l'inoculum devient négligeable
25 (rapport kg d'air / kg de produit très faible). Pour le type de
protection que l'on veut assurer, les films de polypropylène
correspondent à un matériau d'emballage approprié tel que Pryphane
commercialisé par R.P.Films. Les films de polypropylène assurent une
bonne stabilité thermique (non conductivité, non réflectivité), une
30 faible transmission de la lumière, une bonne perméabilité aux gaz.

Il est possible d'associer un deshydratant dans le sachet
d'emballage.

Au moyen de la présente invention, il a été possible de con-
server des Rhizobium pendant une période d'au moins deux années
35 sans aucune perte décelable.

Un avantage de l'invention est de pouvoir insérer dans
l'inoculum des produits du type antifongiques sans aucune altéra-
tion de la cellule bactérienne. Les produits pouvant être utilisés

à l'intérieur de l'inoculum sont notamment du genre thirame, éthyl phosphite d'aluminium. A des activités de l'eau inférieures à 0,1 il n'y a aucune perte due à la présence de l'antifongique.

5

TABLEAU I

	:	:	Log du nombre de <u>Rhizobium</u> /g						:	
	:	TRAITEMENTS	:	après 30 jours de stockage (25°C)						:
10	:	:	:	<u>Activité de l'eau</u>						:
	:	:	:	0,06	0,22	0,39	0,43	0,52	0,75	:
	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
	:	Inoculum A	:	:	:	:	:	:	:	:
	:	sans thirame	:	7,82	7,74	7,43	7,39	0	0	:
15	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
	:	Inoculum A	:	:	:	:	:	:	:	:
	:	avec thirame	:	:	:	:	:	:	:	:
	:	dans les propor-	:	8,83	8,62	8,04	7,97	5,65	0	:
	:	tions (1/2)	:	:	:	:	:	:	:	:
20	:	Inoculum A	:	:	:	:	:	:	:	:
	:	éthyl	:	8,81	0	0	0	0	0	:
	:	phosphite	:	:	:	:	:	:	:	:
	:	d'aluminium (1/1):	:	:	:	:	:	:	:	:
	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:

25

thirame Disulfure de bis (biméthyl-thiocarbamyl)
m.a. 90 % - solubilité : 30 ppm.

Log du nombre de Rhizobium /g d'inoculum avant stockage : 9,04

30

PREPARATIONS DES INOCULUMS

I°) Préparation d'un inoculum gel Xanthane-caroube

On obtient les inoculums suivants :

- un inoculum A, Xanthane-caroube-mannitol si le mannitol a été utilisé comme source hydrocarbonée du milieu de culture ;

35

- ou un inoculum B, Xanthane-caroube-glycérol si le glycérol a été utilisé comme source carbonée du milieu de culture ;

- ou un inoculum C Xanthane-caroube-DE-40 si le sirop de glucose DE-40 a été utilisé comme source carbonée du milieu de culture ;
- 5 - ou un inoculum D, Xanthane-caroube DE-33 si le sirop de glucose DE-33 a été utilisé comme source hydrocarbonée du milieu de culture ;
- ou un inoculum E, Xanthane-caroube dextrine, si la dextrine a été utilisée comme source hydrocarbonée du milieu de culture ;
- 10 - ou un inoculum F, Xanthane-caroube-amidon, si de l'amidon soluble a été utilisé comme source carbonée du milieu de culture.

Mode de préparation de l'inoculum A

g/l

- 15 - milieu de culture - milieu YEM.
- mannitol 10,0
- extrait de levure DIFCO 1,0
- K_2HPO_4 0,5
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2
- 20 - $FeCl_3$ 0,004
- NaCl 0,2
- le pH est ajusté à 6,8 avec HClN
- stérilisation 120°C
- selon une variante on remplace le mannitol par une autre source carbonée (inoculum B, C, D, E ou F).
- 25

- la souche utilisée de Rhizobium japonicum est la souche G₃ USDA 138 Beltsville dans laquelle le nombre de Rhizobium par ml de culture après incubation (6 jours) est de l'ordre de $2-3 \cdot 10^9$ avec le mannitol ou les différentes sources carbonées utilisées.

- 30 On prépare deux solutions (les valeurs sont données pour la préparation de 300 g d'inoculum).

a) Solution de polysaccharide de type anionique résultant de la fermentation d'hydrates de carbone par un micro-organisme de genre Xanthomonas de PM $> 2 \cdot 10^6$, que l'on désignera par produit 1.

- 35 On amène 100 ml d'eau distillée à 70-80°C, on ajoute 1,5 g du produit 1, on maintient cette température 20 à 30 minutes, sous agitation puis on le ramène entre 40 et 50°C.

b) Solution de farine de graine de caroube = polysaccharide

constitué d'unités β -D-manno pyranosyl (liaisons 1 4) une sur quatre ou cinq étant substituée en C_6 par un α -D-galacto-pyranosyl $PM = 3,1 \cdot 10^5$ que l'on désignera par la suite par produit 2.

5 On procède de la même façon en remplaçant le produit 1 par 1,5 g de farine de graine de caroube (produit 2).

Lorsque les deux solutions sont à 40-45°C, on ajoute, sous agitation, à chacune d'elle, 50 ml de la culture bactérienne. On verse alors, en agitant vigoureusement le mélange culture + poly-
10 saccharide dans le mélange culture + farine de graine de caroube. L'obtention d'un gel consistant est instantanée si les deux solutions sont mélangées vigoureusement.

2°) Préparation d'un inoculum polymère alginate $CaCl_2$

On obtient un inoculum G (alginate- $CaCl_2$) si on utilise le
15 mannitol comme source du milieu YEM.

Trois étapes sont nécessaires.

a) Préparation de la suspension de Rhizobium dans l'alginate.

On dissout dans 100 ml de culture bactérienne 2 g d'alginate de sodium faible viscosité (130-240 cps).

20 b) Gélification. On fait tomber la suspension de Rhizobium dans l'alginate dans une solution de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (170 g/l). La gélification se fait en billes si l'on fait tomber goutte à goutte la suspension dans la solution de $CaCl_2 \cdot H_2O$ en agitant cette solution. La gélification se fait en fibres si l'on verse 20 ml de
25 la solution de $CaCl_2$, sous agitation, dans la solution d'alginate.

c) Lavage. Aussitôt après la gélification, on lave l'inoculum polymère en billes (ou en fibres), dans l'eau courante.

3°) Préparation d'un inoculum polymère alginate $CaSO_4$ (gel)

On obtient un inoculum H alginate $CaSO_4$ si on utilise le
30 mannitol comme source carbonée du milieu YEM.

Deux étapes sont nécessaires :

a) Préparation de la suspension de Rhizobium dans un alginate de viscosité comprise entre 750 et 1000 cps. On dissout dans 80 ml de culture bactérienne 1 g d'alginate. Pour cela, on disperse la
35 poudre en pluie fine sur la culture en l'agitant continuellement jusqu'à solubilisation complète de l'alginate.

b) Gélification

On ajoute à la suspension de Rhizobium dans l'alginate 20 ml

d'une solution de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ à 6 g/l. La prise en masse du gel est instantanée.

Dans les exemples suivants, on a réglé l'activité de l'eau au
5 moyen de solutions saturées dont les valeurs des activités de
l'eau a_w à une température de 25°C sont exposées dans le tableau II.

TABLEAU II

10	:	SOLUTES	:	Valeur de a_w	:
	:	(Solutions saturées)	:	25°C	:
	:		:		:
	:	NaOH	:	0,0695	:
15	:	Actigel	:	0,11	:
	:	$\text{KC}_2\text{H}_3\text{O}_2(1,5 \text{ H}_2\text{O})$:	0,226	:
	:	MgCl_2	:	0,3273 0,332	:
	:	CrO_3	:	0,396	:
	:	$\text{K}_2\text{CO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$:	0,438 0,4276	:
20	:	$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$:	0,5288	:
	:	$\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$:	0,535	:
	:	NaBr	:	0,5770	:
	:	CuCl_2	:	0,886	:
	:	NaNO_3	:	0,7373	:
25	:	NaCl	:	0,7532	:
	:	KCl	:	0,8432	:
	:	KNO_3	:	0,920	:
	:	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$:	0,927	:

30 On a illustré dans les divers tableaux et courbes l'influence
d'un certain nombre de paramètres.

Exemple 1 : Il représente la valeur de l'activité de l'eau en relation avec le taux d'humidité pour différents types d'inoculums en fonction du gel et de la source hydrocarbonée (figure 1).

5

	N° Courbe	:	:	:	:
	et type	Source hydrocarbonée	Gel	Type de séchage	:
	d'inoculum	:	:	:	:
	:	:	:	:	:
10	:	:	:	:	:
	1 (B)	Glycérol	Gomme Xanthane	à l'air	:
	:	:	Caroube	:	:
	2 (G)	Mannitol	Alginate	à l'air	:
	3 (A)	Mannitol	Xanthane Caroube	à l'air	:
15	4	Mannitol	sans	Lyophilisation	:
	5	Mannitol	sans	Deshydratation	:
	:	:	:	sous vide	:
	6	Mannitol	sans	sur tourbe	:
	:	:	:	:	:

20

Les petites flèches montrent le phénomène de cristallisation du mannitol.

Exemple 2 : Il montre l'effet de la température (55°C) sur la survie des Rhizobium au cours du stockage dans l'inoculum A (figure 2 A) contenant comme source hydrocarbonée le mannitol et dans l'innoculum B (figure 2 B) contenant comme source hydrocarbonée le glycérol en fonction de l'activité de l'eau (tracé 1, $a_w = 0,09$; tracé 2, $a_w = 0,11$; tracé 3, $a_w = 0,22$; tracé 4, $a_w = 0,32$; tracé 5, $a_w = 0,43$; tracé 6, $a_w = 0,52$).

25

Ces deux figures montrent que la conservation des micro-organismes est bien meilleure avec un sucre en C_6 qu'avec un sucre en C_3 .

30

Exemple 3 : Il représente les courbes de survie du Rhizobium dans l'inoculum A (xanthane caroube et mannitol) en fonction de l' a_w après différents temps de stockage à 25° C (tracé 1 = 10 j ; tracé 2 = 20 j ; tracé 3 = 30 j ; tracé 4 = 80 j ; tracé 5 = 110 j ; tracé 6 = 180 j). (Figure 3)

35

Exemple 4 : Il représente la survie du Rhizobium au cours du stockage à 28° C dans l'inoculum A (xanthane caroube et mannitol) et dans l'inoculum H (alginate et mannitol) en fonction du temps et de différents a_w , courbe I $a_w = 0,06$, courbe II $a_w = 0,42$ (figure 4).

Elle permet de voir qu'il n'existe aucune différence significative dans la survie du Rhizobium entre les différents polysaccharides.

Exemple 5 : Il illustre les courbes de survie du Rhizobium en fonction de la source hydrocarbonée présente dans le milieu de culture.

tracé A = mannitol
tracé B = glycérol
tracé C = glucose DE 40
tracé D = glucose DE 33
tracé E = dextrine
tracé F = amidon

pendant un stockage de 10 jours à 28°C aux différents a_w . (Figure 5)

Exemple 6 : Il représente les courbes de survie de trois souches de Rhizobium inclus dans le polymère A après 10 jours de stockage (28°C) (tracé 1 Rhizobium Japonicum USDA 138 Beltsville ; tracé 2 Rhizobium meliloti 2011, INRA DIJON ; tracé 3, Rhizobium phaseoli souche Olivia Université Minnesota, USA). (Figure 6)

Exemple 7 : Il représente les courbes de survie du Rhizobium japonicum dans l'inoculum A pour les graines de soja (ex. Kingsoy) préenrobées en fonction de l' a_w et à deux températures (tracé 1, 28°C ; tracé 2, 4°C) après 60 jours de stockage. (Figure 7)

Exemple 8 : On a séché les inoculums A et H dans un atomiseur tel que décrit dans l'ouvrage de Masters Spray Drying - second edition John Wiley & Sons 1976-, en mettant en oeuvre un atomisateur à turbine.

En utilisant une température de sortie de 75°C et en faisant varier la température d'entrée entre 150 et 250°C, on a pu constater que le log n Rhizobium vivant par gramme de poudre atomisée demeurait stable et égal à la valeur de départ c'est-à-dire 10^{10} Rhizobium par gramme. Il n'y a donc pas destruction du Rhizobium et l'on peut obtenir une présentation en poudre.

REVENDECATIONS

1°) Procédé de préparation d'inoculum à longue viabilité et à résistance à la température améliorée, caractérisé en ce que on
5 inclut le(s) micro-organisme(s) dans son milieu de culture dans un gel de polymère et que l'on abaisse l'activité de l'eau dans l'inoculum en-dessous de 0,1 et qu'on la maintient à cette valeur.

2°) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le polymère est du groupe des polysaccharides auquel on fait subir
10 une réticulation au moins partielle.

3°) Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le polysaccharide est réticulé par l'un des modes de traitement suivants : thermique, à l'aide d'un sel métallique au moyen d'un autre polymère.

15 4°) Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le polymère est un hétéropolymère à base de gomme xanthane et de farine de caroube.

5°) Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le polymère est un polymère à base d'alginate.

20 6°) Procédé selon les revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le milieu de culture contient une source hydrocarbonée choisie parmi les sucres, les polyols et les polysaccharides.

7°) Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que la source hydrocarbonée est choisie parmi les sucres, les polyols
25 d'au moins 6 carbones.

8°) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que la source hydrocarbonée est du groupe mannitol, sorbitol, fructose, dextrine et amidon.

9°) Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé
30 en ce que le milieu de culture renferme une source azotée minérale ou organique telle que l'extrait de levure.

10°) Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le milieu de culture renferme au moins un sel minéral.

11°) Procédé selon les revendications 1 à 10, caractérisé en
35 ce que le micro-organisme est du genre Rhizobium.

12°) Procédé selon la revendication 11 caractérisé en ce que le micro-organisme est le Rhizobium Japonicum.

13°) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que

l'activité de l'eau est abaissée par atomisation.

14°) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que
l'activité de l'eau est abaissée par atomisation et passage sur un
5 lit fluidisé.

15°) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que
l'on insère dans l'inoculum un antifongique.

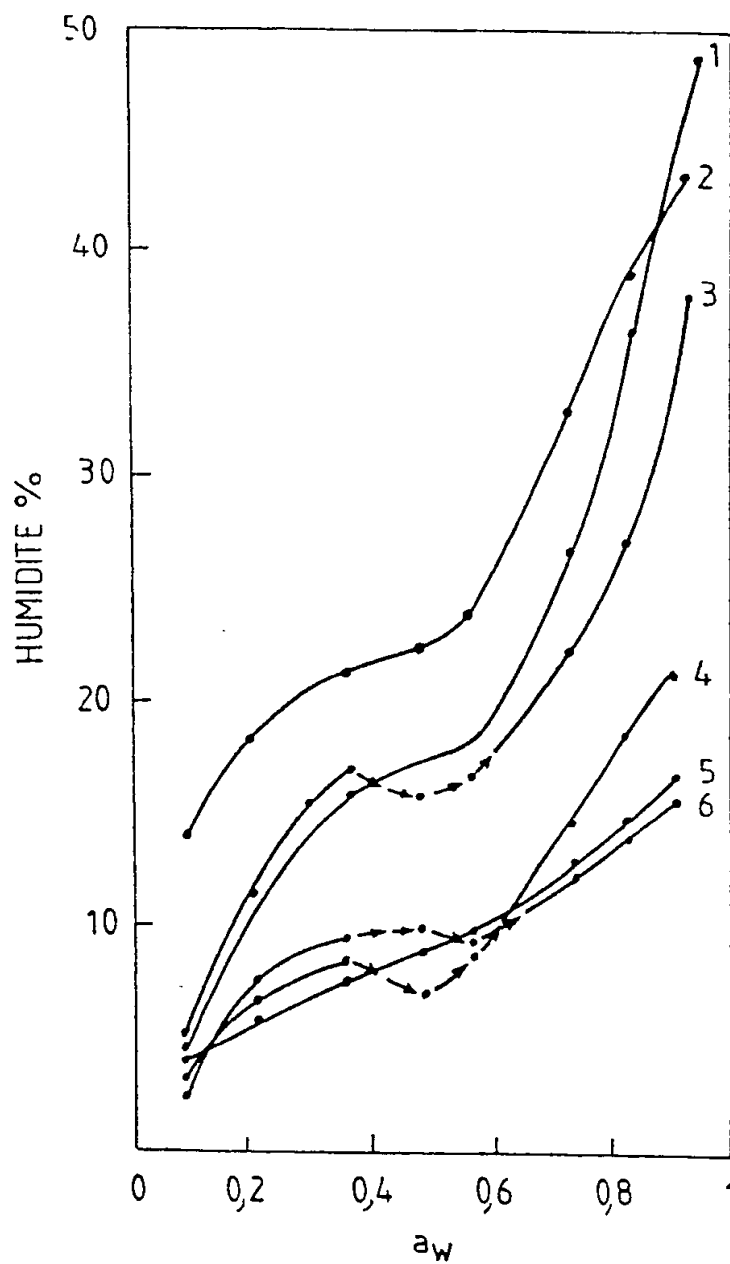
16°) Inoculum selon les revendications 1 à 11, caractérisé en
ce que le polymère est du groupe des polysaccharides au moins
10 partiellement réticulé, que la source hydrocarbonée est du groupe
du mannitol, sorbitol, fructose, glucose, dextrine, amidon et que le
micro-organisme est un Rhizobium.

17°) Application de l'inoculum au préenrobage des graines.

18°) Application de l'inoculum à l'inoculation du sol.

1 / 5

FIG.1



2 / 5

FIG. 2

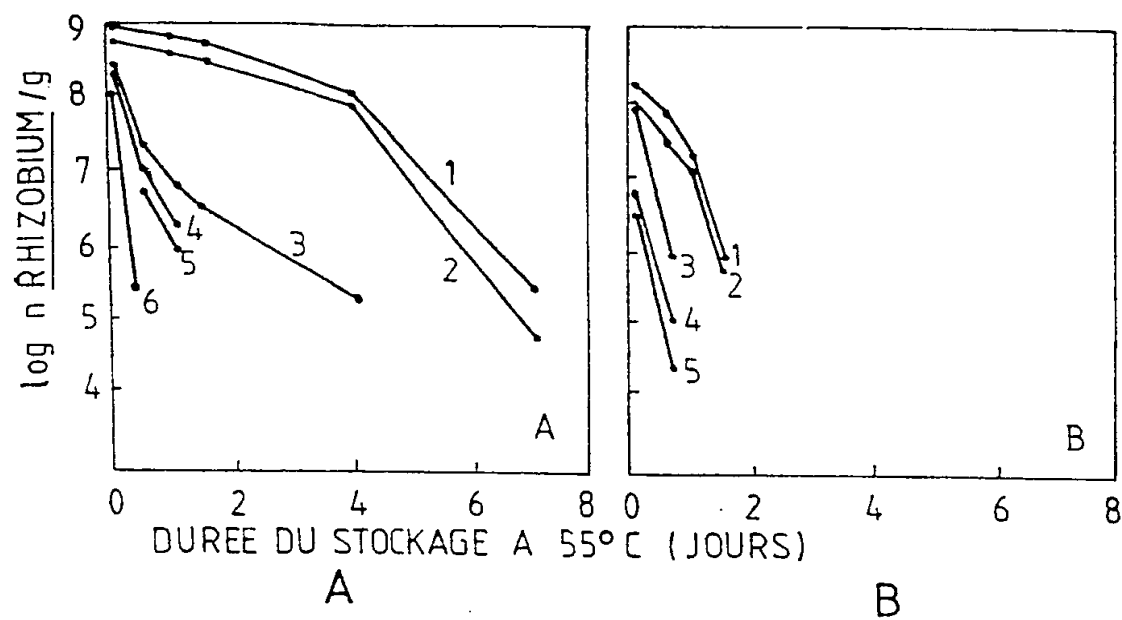
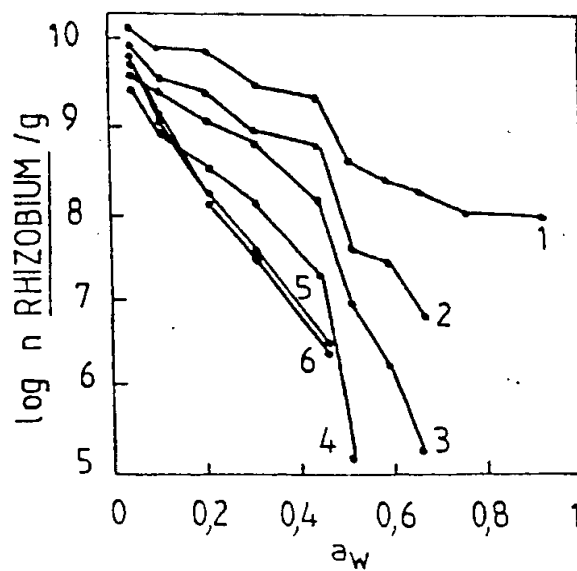
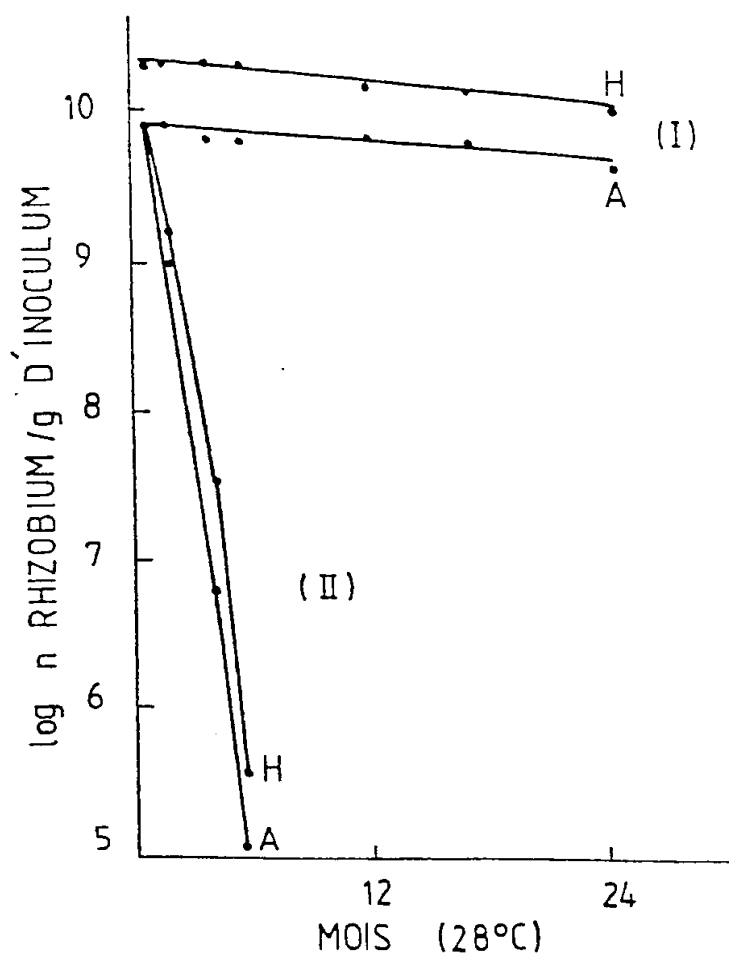


FIG. 3



3 / 5

FIG. 4



4/5

FIG. 5

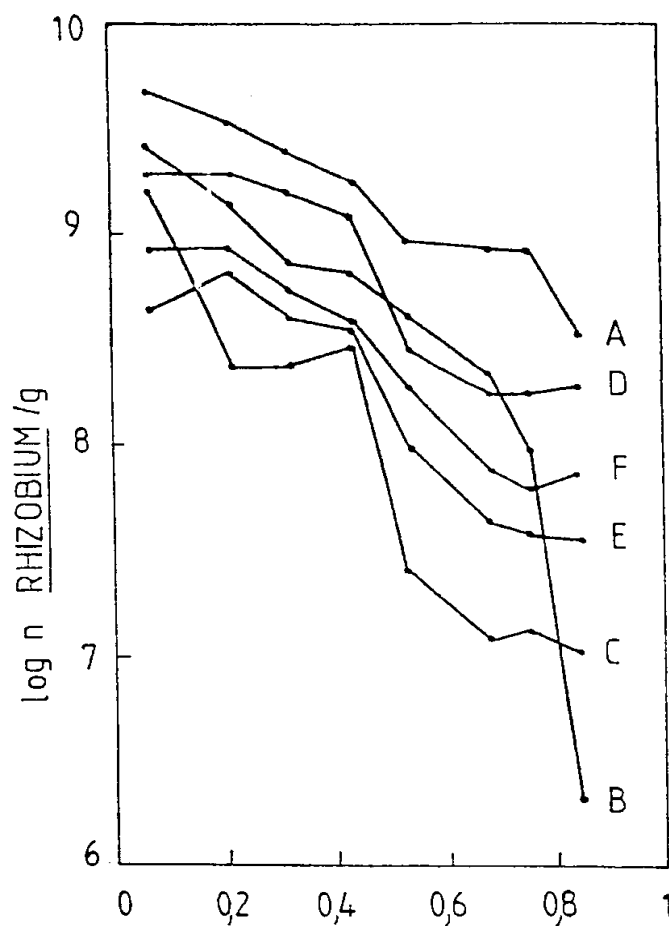


FIG. 6

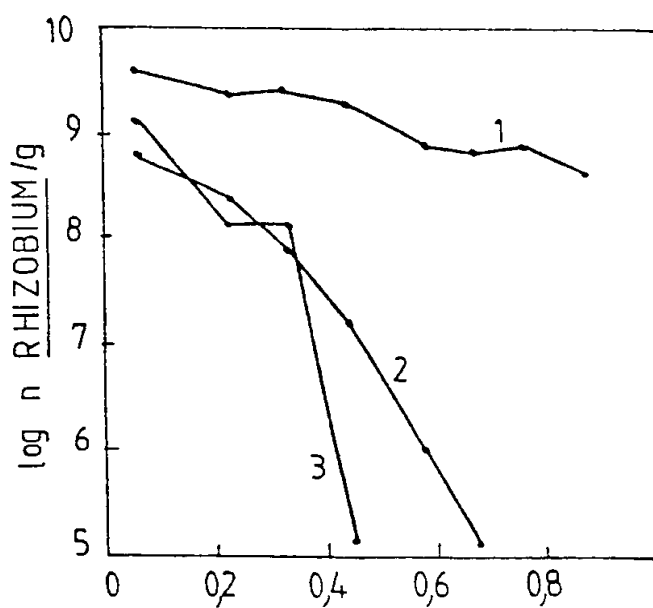
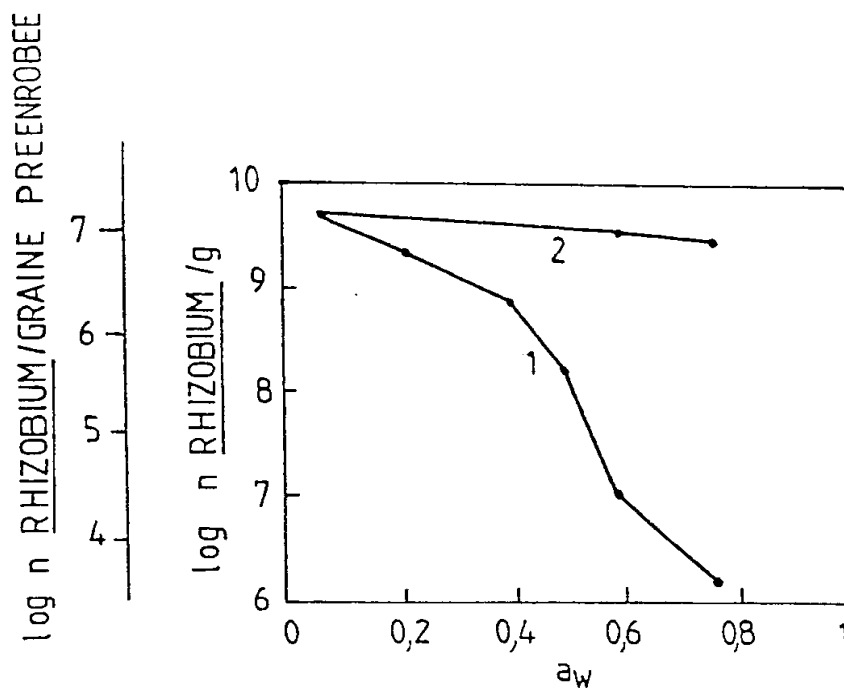


FIG. 7





Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

0083267
Numéro de la demande

EP 82 40 2300

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl. 3)
D, Y	US-A-3 168 796 (J.R. SCOTT et al.) * Colonne 3, ligne 19 - colonne 4, ligne 2; colonne 5, lignes 21-32; colonne 6, lignes 45-72; colonne 8, lignes 13-16, 39-55; colonne 10, lignes 41-55, 65-69 *	1-18	C 12 N 11/04 C 12 N 1/04 C 05 F 11/08
D, Y	--- EP-A-0 017 565 (RHONE-POULENC) * Revendications 1-16; page 3, ligne 12 - page 4, ligne 7; page 4, lignes 26-27; page 7, ligne 27 - page 8, ligne 7 *	1-18	
Y	--- FR-A-2 303 080 (MILES LABORATORIES) * Page 3, ligne 19 - page 4, ligne 15; page 4, ligne 35 - page 5, ligne 30; page 7, lignes 3-15, 31-37; page 8, ligne 28 - page 9, ligne 4; page 9, ligne 38 - page 10, ligne 6; page 11, lignes 8-30; revendications 1-20 *	1-18	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl. 3)
Y	--- BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 69, no. 8, 1980, page 5824, no. 54441, Philadelphia, USA J.J. PENA-CABRIALES et al.: "Survival of Rhizobium in soils undergoing drying" & SOIL SCI. SOC. AM. J., 43(5), 962-966, 1979 * En entier *	1-18	C 12 N C 05 F
Le présent rapport de recherche a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 25-03-1983	Examineur RYCKEBOSCH A.O.A.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

OE B Form 1503 03 82



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

0083267

Numéro de la demande

EP 82 40 2300

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			Page 2												
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl. 3)												
Y	FR-A-2 469 861 (A.N.V.A.R.) * Page 3, lignes 4-17; page 4, ligne 23 - page 5, ligne 4; page 6, ligne 13 - page 8, ligne 18; exemples 3,6; revendications 1-11 *	1-18	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl. 3)												
Y	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 80, no. 5, 4 février 1974, page 317, no. 25905p, Columbus, Ohio, USA & JP - A - 73 08830 (YAKULT HONSHA CO., LTD.) 17-03-1973 * En entier *	1-18													
Y	--- MICROBIOLOGY ABSTRACTS, serie A: Industrial microbiology, vol. 4, no. 8, mai 1969, no. A4153, Londres, G.B. & SU - A - 227 279 (V.V. PATRIKEYEV et al.) * En entier *	1-18													
A	--- US-A-3 616 236 (P.S. DELIN) -----														
Le present rapport de recherche a été établi pour toutes les revendications															
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 25-03-1983	Examineur RYCKEBOSCH A.O.A.												
<table border="0"><tr><td>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</td><td>T : théorie ou principe à la base de l'invention</td></tr><tr><td>X : particulièrement pertinent à lui seul</td><td>E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date</td></tr><tr><td>Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie</td><td>D : cite dans la demande</td></tr><tr><td>A : arrière-plan technologique</td><td>L : cite pour d'autres raisons</td></tr><tr><td>O : divulgation non-écrite</td><td></td></tr><tr><td>P : document intercalaire</td><td>& : membre de la même famille, document correspondant</td></tr></table>				CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES	T : théorie ou principe à la base de l'invention	X : particulièrement pertinent à lui seul	E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date	Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie	D : cite dans la demande	A : arrière-plan technologique	L : cite pour d'autres raisons	O : divulgation non-écrite		P : document intercalaire	& : membre de la même famille, document correspondant
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES	T : théorie ou principe à la base de l'invention														
X : particulièrement pertinent à lui seul	E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date														
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie	D : cite dans la demande														
A : arrière-plan technologique	L : cite pour d'autres raisons														
O : divulgation non-écrite															
P : document intercalaire	& : membre de la même famille, document correspondant														

OEI Form 1503 03 82